ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีฤทธิ์ยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

Efficacy of *Citrus aurantium* L. essential oil for inhibition of *Aspergillus* sp. in fresh bread products

สุนีย์ เจริญวุฒิธรรม[1*] และพยงค์ วณิเกียรติ[1]

Sunee Charoenvuttitham[1*] and Payong Wanikiat[1]

Received: July 19, 2021
Revised: August 24, 2021
Accepted: August 27, 2021

Abstract: *Citrus aurantium* L. Orange peel essential oil (CaEO) is terpene and phenylpropene organic compound, which has antimicrobial activity and is safe when used as a food preservative. Therefore, CaEO was used to evaluate for its efficacy in inhibiting *Aspergillus* sp., cause of spoilage in fresh bread products by poisoned food technique and the antioxidant activity of CaEO was determined by spectrophotometric method using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay). The results showed that CaEO at concentrations of 2.50, 5.00 and 10.00 µl/ml was able to inhibit the growth of *Aspergillus* sp. colony with a colony diameter of 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 and 1.63 ± 0.09 cm, respectively, compared to the sterile distilled water used as a control (2.98 ± 0.05 cm).It was found that CaEO at a concentration of 10.00 µl/ml had an inhibitory effect comparable to that of 0.2% calcium propionate used as a reference compound with a colony diameter of 1.50 ± 0.23 cm, which was significantly different to the control ($p \leq 0.05$). CaEO at concentrations of 5.00 and 10.00 µl/ml were used as an ingredient in fresh bread products with calcium propionate as reference compound and the sterile distilled water as control. Fresh bread kept for 1-4 days showed no changes and fewer black spots on the bread surface were found on the 5th day as compared to the control with more black spots, while fresh bread with the reference compound showed no microorganisms on it. When fresh bread was cultured in PDA agar and incubated at 27°C, CaEO at concentrations of 5.00 µl/ml was found to have fungal growth of 8.20 colonies per 1 g of sample (CFU/g) on the 4th day, while CaEO at a concentration of 10.00 µl/ml and calcium propionate solution showed no fungal growth. The antioxidant activity of CaEO was assessed by DPPH scavenging assay. It was found that CaEO exhibited very low antioxidant activity with EC_{50} > 1,000 µg/ml, compared to a standard solution α-tocopherol (Vitamin E), with possesses very high radical scavenging with an EC_{50} value of 43.47 µg/ml. Therefore, the CaEO at a concentration of 10.00 µl/ml exhibited highest inhibitory effect on *Aspergillus* sp Its effect was comparable to that of calcium propionate and the CaEO possesses very low in antioxidant activity.

Keywords: Essential oil; Antifungal activity; free radical scavenging

---

[1]สาขาวิชาการแพทย์บูรณาการ วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต 110/1-4 ถนนประชาชื่น หลักสี่ กทม. 10210

[1]Department of College of Integrative Medicine (CIM), Faculty of College of Integrative Medicine, Dhurakij Pundit University,110/1-4, Prachachuen Rd., Laksi, Bangkok, 10210

*Corresponding author: tasterpro@gmail.com

Agricultural Science and Management J. 4 (2) : 60-68 (2021)

บทคัดย่อ: น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. (CaEO) เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกเทอร์พีนส์ และฟีนีลโพรพีน ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีความปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร จึงนำ CaEO มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. สาเหตุการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด ด้วยวิธี poisoned food technique และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกโดยทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH assay) ผลการทดสอบพบว่า CaEO ที่ความเข้มข้น 2.50, 5.00 และ 10.00 µl/ml สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีรา *Aspergillus* sp. ได้โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 และ 1.63 ± 0.09 cm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม (2.98 ± 0.05 cm) และพบว่า CaEO ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีฤทธิ์ยับยั้งได้ใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต 0.2% ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 1.50 ± 0.23 cm ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารละลายน้ำที่เป็นชุดควบคุม ($p \leq 0.05$) เมื่อนำ CaEO ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด โดยมีแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดอ้างอิง และสารละลายน้ำเป็นส่วนประกอบเป็นชุดควบคุม พบว่าขนมปังสดที่เก็บรักษา 1-4 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ และในวันที่ 5 พบจุดสีดำเล็กๆบนผิวขนมปังจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีจำนวนจุดดำมากกว่า ในขณะที่ชุดอ้างอิงไม่พบจุลินทรีย์บนผิวหน้าขนมปังสด เมื่อนำขนมปังสดเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเพาะ ที่อุณหภูมิ 27°C ในวันที่ 4 พบว่า CaEO ความเข้มข้น 5.00 µl/ml มีราเกิดขึ้น 8.20 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g) ในขณะที่ CaEO ความเข้มข้น 10.00 µl/ml และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนต ไม่มีราเกิดขึ้น และการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า CaEO แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ โดยมีค่า EC_{50} > 1,000 µg/ml เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน **α**-tocopherol (Vitamin E) ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่ามีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 µg/ml ดังนั้น CaEO ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้สูงสุด ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต และ CaEO นี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ต่ำ

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำนำ

ขนมปังเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ขนมอบหรือเบเกอรี่ เป็นผลิตภัณฑ์อาหารกึ่งแห้ง (Intermediate moisture food) ซึ่งมักจะเกิดการเน่าเสียได้รวดเร็ว ส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ในกลุ่มราที่อยู่ในสกุล *Aspergillus* sp. โดยจะทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเปลี่ยนแปลง ทั้งกลิ่น สีและรสชาติ รวมทั้งมีการสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค น้ำมันหอมระเหยถูกนำมาใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาเนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อย ราคาถูกและเป็นสารธรรมชาติ อีกทั้งยังช่วยปรุงแต่งสีกลิ่นรสของอาหารให้น่ารับประทานมากยิ่งขึ้น (วิภาวัน,2549)

มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดของพืชตระกูลส้ม Fisher and Phillips (2006) พบว่าในน้ำมันหอมระเหยของมะนาว ส้มเขียวหวานและมะกรูด มีสารประกอบของ Linalool และ Citral ซึ่งสารดังกล่าวมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Campylobacter jejuni, Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ Yi *et al*. (2008) ได้รายงานว่าในพืชตระกูลส้ม เช่น ส้มเขียวหวาน (*Citrus* reticulata Blanco) ส้มโอ (*Citrus grandis* (L.) osbects (Linn.) มะกรูด (Citrus hystrix DC.) ส้มโชกุน (*Citrus reticulata* cv. Shogun) และมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) มีสารที่สำคัญชื่อว่า Hesperidin ซึ่งพบในเปลือกของพืชตระกูลส้มสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli, Salmonella Typhi, Enterococcus faecalis, S. epidermidis* และ *S. aureus* และสารประกอบ

บางชนิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราได้ดี (ธิราภา และ คณะ, 2536) และน้ำมันหอมระเหยยังได้รับการพิจารณาจากองค์การอาหารและยา (FDA) ว่าสามารถใช้เติมลงไปในอาหารได้อย่างปลอดภัย Generally recognized as safe; (GRAS) (Simas *et al*. 2017)

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ที่เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ขนมปังสดโดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม(CaEO)โดยทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ในผลิตภัณฑ์ขนมปังสดและทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CaEO เพื่อนำไปสู่การพัฒนานำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ

น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม *Citrus aurantium* L. (Family of Rutaceae) ที่ได้มาจากกระบวนการสกัดแบบบีบเย็น (cold-pressed) จากเปลือกด้านนอกของผลส้มสุก (orange peel oil) เป็นของเหลวใสสีน้ำตาลออกเหลืองอ่อน มีกลิ่นส้มสดๆ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย จีน จำกัด กรุงเทพฯ

2. ราที่ใช้ในการทดสอบ

รา *Aspergillus* sp. ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์จุลินทรีย์ (TISTR) สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3. การทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.(CaEO) ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ด้วยวิธี poisoned food technique

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่มีสารละลาย CaEO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.32, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 µl/ml ตามลำดับ เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อตั้งทิ้งไว้ในอาหารแข็งเพื่อนำใช้ทดสอบต่อไป โดยจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายน้ำ เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตซึ่งเป็นสารมาตรฐานเป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO ในจานเพาะเชื้อ โดยนำรา *Aspergillus* sp. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน นำ Cork borer จุ่มลงในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% ลนไฟและพักทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเจาะบริเวณขอบของเส้นใยรา ย้ายชิ้นวุ้นวางในจานเพาะเชื้อ ซึ่งมีส่วนผสมของสารละลาย CaEO ในความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 27°C ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 7 วัน ติดตามผลการเจริญของรา บันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา แล้วนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

4. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

นำ CaEO ที่มีฤทธิ์การยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้ดี 2 ระดับความเข้มข้น มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด โดยเตรียมขนมปังสดที่มี CaEO เป็นส่วนประกอบของขนมปังสดเป็นชุดทดสอบ และมีแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดอ้างอิง และสารละลายน้ำเป็นส่วนประกอบเป็นชุดควบคุมลบ โดยมีการทดสอบ 2 วิธี กล่าวคือ วิธีแรก สังเกตลักษณะปรากฏภายนอกและการเปลี่ยนแปลงของขนมปังสดในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน และ การทดสอบอีกวิธีหนึ่ง คือ ศึกษาจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น โดยทำการนับจำนวนโคโลนีราในขนมปัง ซึ่งใช้เทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27°C เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีรา

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CaEO

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ของ CaEO ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-l-1-picrylhydrazil assay (DPPH assay) โดยใช้ DPPH (2,2-diphenyl-l-1-picrylhydrazil) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว

(Figure 1) ละลายในเมทานอลได้สารละลายนี้มีสีม่วง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วย microplate reader เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในเมทานอล อะตอมไฮโดรเจนจากอนุมูลอิสระ (AH) จะถูกถ่ายให้ DPPH• เกิดเป็นสารใหม่ที่มีฤทธิ์เป็นอนุมูลอิสระ DPPH-H (Figure 2) โดยที่สารสีม่วงของ DPPH•จะจางลงเป็นสีเหลือง ซึ่ง DPPH ทำปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R•) ได้สารใหม่ที่ไม่มีฤทธิ์เป็นอนุมูลอิสระ DPPH-H ดัง (Figure 3)

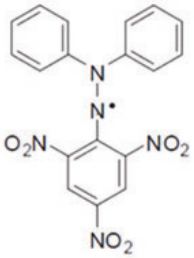

Figure 1 Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)

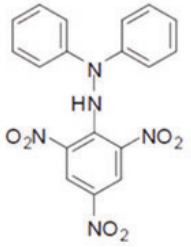

Figure 2 Diphenylpicrylhydrazyl (non radical)

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$
$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R$$

Figure 3 The reduction of DPPH radical scavenging

การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารทดสอบคือ CaEO ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารละลายมาตรฐาน **α**-tocopherol (Vitamin E) โดยมีสารละลาย DPPH เป็น สารละลายควบคุม (DPPH Control) ใช้สารละลาย 20% Tween 20 ในเมทานอลเป็นตัวทำละลายทั้งสารละลาย CaEO, สารละลายมาตรฐาน Vitamin E และ DPPH ละลายในสารละลาย 20% Tween 20 ในเมทานอล และ CaEO ที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 µg/ml และโดยการนำสารละลาย DPPH 1.0 mM ในเมทานอล และ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E มีความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125 และ 250 µg/ml ทำการเติมสารทั้งหมดลงใน 96 - well plate (ปริมาตร 200 µl ต่อ well) ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Thermo Scientific™ microplate readers ความสามารถในการต้านออกซิเดชั่น หรือ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ CaEO และ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E รายงานเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งคือความเข้มข้นของ CaEO หรือ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E ที่ทำให้ปริมาณของ DPPH ลดลง 50% หรือ อาจกล่าวว่าทำให้ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH 50% ซึ่งใช้ค่า EC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารละลายตัวอย่างของ CaEO กับ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E การหาค่า EC_{50} ได้จากการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ CaEO หรือสารละลายมาตรฐาน Vitamin E และ % Radical Scavenging Activity (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ของ CaEO หรือ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E ซึ่งคำนวณได้ดังสมการ

$$\% \text{ Radical Scavenging Activity} = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของ CaEO ผสมกับ สารละลาย DPPH Radical

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย 20% Tween 20 ผสมกับ สารละลาย DPPH Radical

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ของ CaEO บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทั้ง 3 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ย และ ความแปรปรวนในแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$ โดยใช้ Duncan's Multiple Range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO ในหลอดทดลอง (*in vitro*) เมื่อนำสารสกัด CaEO ที่ระดับความเข้มข้น 0.32, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 และ10.00 µl/ml ตามลำดับ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งรา *Aspergillus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้ผลการทดลองดังแสดงใน (Table 1)

Table 1 Antifungal activity of essential oil of CaEO against *Aspergillus* sp.

Incubation time (Days) / CaEO concentration (µl/ml)	Experiment set		
	Average diameter of *Aspergillus* sp. colony (cm)		
	3	5	7
0.32	3.00 ± 0.17^{c}	4.30 ± 0.19^{c}	6.32 ± 0.20^{d}
0.63	2.88 ± 0.02b^{c}	4.32 ± 0.11^{c}	5.66 ± 0.87^{cd}
1.25	2.73 ± 0.1b^{c}	4.05 ± 0.53^{c}	6.12 ± 0.12^{cd}
2.50	2.68 ± 0.1^{bc}	3.75 ± 0.11^{bc}	5.43 ± 0.09^{bcd}
5.00	2.40 ± 0.24^{b}	3.15 ± 0.11^{ab}	4.82 ± 0.10^{abc}
10.00	1.63 ± 0.09^{a}	2.39 ± 0.03^{a}	3.51 ± 0.12^{a}
Calcium propionate solution	1.50 ± 0.23^{a}	2.29 ± 0.28^{a}	4.30 ± 0.00^{ab}
Water solution	2.98 ± 0.05^{c}	4.49 ± 0.16^{c}	6.85 ± 0.07^{d}

Note: $^{a-d}$ Means with the different letters in the same column were significantly different ($p<0.05$).

จากผลการศึกษาพบว่าที่ระยะเวลาของการบ่มวันที่ 3 สารสกัดของ CaEO ที่ความเข้มข้น 2.50, 5.00 และ 10.00 µl/ml ตามลำดับ สามารถยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้โดยวัดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราได้ 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 และ 1.63 ± 0.09 cm ตามลำดับ CaEO ที่ความเข้มข้น 2.50 µl/ml ให้ผลการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมเชิงลบ (2.98 ± 0.05 cm) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ CaEO ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีฤทธิ์ยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้ไม่แตกต่างกันกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต 0.2% ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราได้เท่ากับ 1.50 ± 0.23 cm ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Knobloch *et al*. (1988) ที่รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีองค์ประกอบของสารเคมีหลายๆ กลุ่มที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์และทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และการศึกษาของ Sharma and Tripathi (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก epicarp ของ *C. sinensis* (L.) Osbeck มีผลต่อการเติบโตและลักษณะรูปร่างของ *Aspergillus niger* (L.) van Tiegherm โดยเส้นใย (mycelium) ถูกยับยั้งและตายที่ความเข้มข้น 2.50 และ 3.00 µg/ml ตามลำดับ และ Lanciotti *et al*. (2004) พบว่า สารประกอบออกซิจิเนตเป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งราได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดย Caccioni *et al*. (1998) รายงานว่า 60% ของน้ำมันหอมระเหยสามารถต้านรา สารประกอบบางชนิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราได้ดี เช่น รา

Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus funigatus, Aspergillus terreus, Aspergillus parasiticus เป็นต้น และยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มาจากชิ้นส่วนของพืชที่แตกต่างกันมีองค์ประกอบที่ต่างกันและประสิทธิภาพของการยับยั้งราของน้ำมันหอมระเหยนั้น ขึ้นอยู่วิธีการนำไปใช้อีกด้วย (Lota *et al*., 2000)

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ของ CaEO บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ของ CaEO ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า สารละลายของ CaEO ที่ระดับความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ได้ดี ดังนั้นจึงได้เลือกสารละลายของ CaEO ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด โดยการเตรียมขนมปังสดที่มี CaEO ที่ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml เป็นส่วนประกอบและใช้สารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดควบคุม การสังเกตลักษณะปรากฏภายนอกและการเปลี่ยนแปลงของขนมปังสดในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ในระหว่างการเก็บรักษาวันที่ 1-4 ลักษณะปรากฏภายนอกของขนมปังสดไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ แต่ในวันที่ 5 พบจุดสีดำขนาดเล็กบนผิวขนมปังแต่จำนวนของจุดสีดำมีน้อยกว่าน้ำซึ่งเป็นชุดควบคุมลบ โดยจุดสีดำเหล่านี้มีขนาดใหญ่ขึ้นและทำให้ขนมปังสดมีกลิ่นเหม็นหืนมากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีส่วนผสมของแคลเซียมโพรพิโอเนตไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์บนผิวหน้าขนมปังสด (Figure 4)

Figure 4 Growth of *Aspergillus* sp. in fresh bread product
Note: A) Fresh bread with calcium propionate
B) Fresh bread with 5 µl/ml of CaEO
C) Fresh bread with 10 µl/ml of CaEO

และเมื่อนับจำนวนโคโลนีของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าระหว่าง 1-3 วันของการเก็บรักษานั้น ไม่พบการเจริญของรา แต่หลังจากเก็บรักษาขนมปังเป็นเวลา 4 วัน พบว่า ขนมปังที่มี CaEO ที่ความเข้มข้น 5.00 µl/ml มีจำนวนเฉลี่ยของราเท่ากับ 8.20 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g) ในขณะที่ขนมปังที่มี CaEO ความเข้มข้น 10.00 µl/ml และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตไม่พบการเจริญของรา ซึ่งสอดคล้องกับ

การศึกษาของ Kurita *et al.* (1981) รายงานว่าส่วนประกอบใน CaEO ต่างๆ เช่น aliphatic aldehydes มีพันธะคู่ตั้งแต่หนึ่งพันธะขึ้นไปที่หมู่คาร์บอนิล เช่น Perillaldehyde ซึ่งมีฤทธิ์ต้านราสูงกว่า tertiary alcohol เช่น Linalool ซึ่งไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของราใดๆ และส่วนหนึ่งอาจมาจากการมี monoterpenes ปริมาณสูงอยู่ใน CaEO สารระเหยที่ปล่อยออกมาจาก CaEO บนพื้นผิวของการเจริญเติบโตของเส้นใย มีผลกระทบต่อการสร้างสปอร์, การเปลี่ยนผ่านไปสู่การผลิตสปอร์, การรับรู้ และกลไกการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นการพัฒนาการสืบพันธุ์ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการยับยั้งราของ CaEO และรายงานของ Debonne *et al.* (2018) ที่รายงานถึงการใช้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งราเพื่อเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ขนมปังโดยศึกษาถึงประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากโรสแมรี่ที่อยู่ในรูปของไมโครเอ็นแคปซูเลชั่นในก้อนแป้งโด

. 3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CaEO ด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ CaEO โดย การวัดค่า 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งในการทดสอบร้อยละการยับยั้งของสารละลายตัวอย่างของ CaEO นี้ พบว่า แต่ละความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง CaEO มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ต่ำมาก (EC_{50} > 1,000 µg/ml) ดัง Figure 5 เมื่อเทียบกับกับสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 µg/ml ดัง (Figure 6)

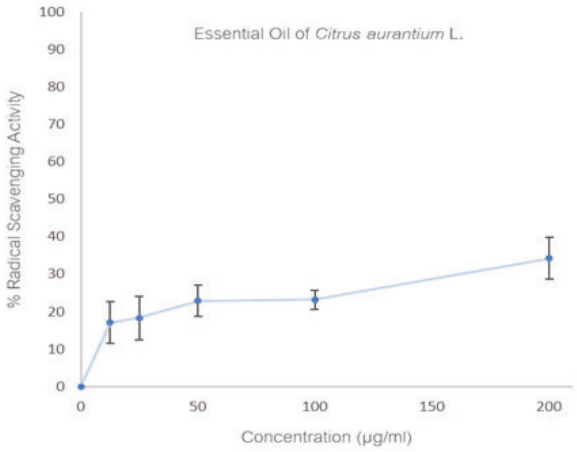

Figure 5 Linear graph of CaEO with % Radical Scavenging Activity value by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay).

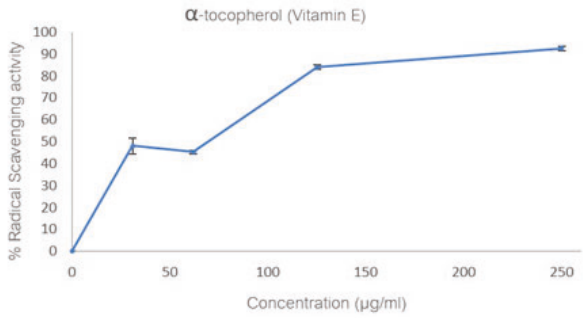

Figure 6 Linear graph of α-tocopherol (Vitamin E) with % Radical Scavenging Activity value by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay).

ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของ CaEO ที่ทำปฏิกิริยาให้อะตอมไฮโดรเจน ได้เป็นสารใหม่ DPPH-H CaEO สามารถทำให้ DPPH ที่เป็นสารสีม่วงให้จางลงเป็นสีเหลืองได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Choi *et al.* (2000) รายงานว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของ น้ำมันจากส้ม 34 ชนิด อยู่ระหว่าง 17-64% เนื่องมาจากในส่วนของเปลือก CaEO นี้ประกอบด้วยสาร Limonene ในสัดส่วนที่มากกว่า 90% เป็นส่วนใหญ่ และมี β-myrcene ซึ่งสารทั้งสองนี้ไม่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดอนุมูลอิสระ และการกำจัดอนุมูลอิสระจะมีค่าสูงขึ้นก็ต่อเมื่อใน CaEO มีส่วนประกอบของสาร geraniol, terpinolene และ γ-terpinene รายงานของ Sarrou *et al.* (2013) ได้ศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของ CaEO ในส่วนของเปลือก (19.29%), ใบอ่อน (22.79%), ดอก (53.98%) และใบแก่ (94.36%) ตามลำดับ ซึ่งใบแก่นี้มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH มากที่สุด อาจเกิดจากการสูญเสียน้ำในใบแก่ซึ่งมีผลต่อการสะสมสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เข้มข้นมากขึ้นในขณะที่มีการเจริญเติบโตของใบแก่ลดลงเรื่อยๆ และอีกประการหนึ่ง คือส่วนประกอบบางชนิดใน CaEO ที่มีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน การที่ CaEO จากใบแก่และดอกแก่ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุดอาจเกิดจากการที่ส่วนใบแก่มี α-terpinolene และ nerol ที่ส่วนของดอกแก่มี γ-terpinene, nerol และ geraniol การศึกษาของ Anwar *et al.* (2016) ได้รายงานถึงพฤกษเคมี (Phytochemical) ของ CaEO ที่สกัดแบบบีบเย็น พบว่ามี Monoterpene, Limonene อยู่ในปริมาณมากถึง 65–97% ของน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด โดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของพืชตระกูลส้มนี้จะมีสารประกอบที่มีความหลากหลายแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม ภูมิประเทศของแหล่งที่ปลูก วิธีการสกัด เวลาในการเก็บเกี่ยว และการดูแลรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ou *et al.* (2015) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยของ *Citrus paradisi* ที่ได้มาจากการสกัดแบบบีบเย็นโดยส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ต่ำกว่า 20% ของน้ำมันหอมระเหยของ *Citrus paradisi* ที่ได้มาจากการสกัดแบบกลั่น โดยมีค่า IC50 > 40 µg/ml

สรุป

จากการศึกษาประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า CaEO ที่ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ได้ดี และการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด พบว่า CaEO ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้สูงสุด ซึ่งให้ผลได้ใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนตที่นิยมใช้ในการยับยั้งราในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด และผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า CaEO นี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ต่ำมาก (EC_{50} > 1,000 µg/ml) เมื่อเทียบกับกับสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 µg/ml

เอกสารอ้างอิง

ธิราภา แสนเสนา นพดล กิตติวราฤทธิ์ มาลิน จุลศิริ และรุ่งระวี เติมศิริฤกษ์กุล. 2536. ฤทธิ์ต้านเชื้อและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสกัดจากผิวผลพืชตระกูลส้ม. โครงการพิเศษ คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล 27(1): 1-5.

วิภาวัน จุลยา. 2549. เอกสารประกอบการสอนวิชาเบเกอรี่. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพวิทยาเขตพระนครใต้.

Anwar S., N. Ahmed, A. Speciak, F. Cimino and A. Saija. 2016. Bitter Orange (*Citrus aurantium* L.) Oils. pp. 259-268. *In*: V.R. Preedy. (Ed.). Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Academic Press, Massachusetts.

Caccioni, D. R. L., M. Guizzardi, D. M. Biondi, A. Renda and G. Ruberto.1998. Relationship between volatile component of citrus fruit oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. International Journal Food Microbiology 43: 27-36.

Choi, H.S., H. S. Song, H. Ukeda and M. Sawamura. 2000. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 4156-4161.

Debonne, E., F.Van Bockstaele, S. Samapundo, M. Eeckhout and F. Devlieghere. 2018. The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. Journal of Essential Oil Research doi: 10.1080/10412905. 2018. 148 6239.

Fisher, K. and C. A. Phillips. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni,* Escherichia coli O157, *Lisetria monocytogenese, Bacillus cereus* and *Stephylococcus aureus in vitro* and in food systems. Journal of Applied Microbiology 101(6): 1232-1240.

Knobloch, K., A. Pauli, N. Iberl, H.M Weis and N. Weig. 1988. Mode of action of essential oil components on whole cell of bacteria and fungi in plate tests. pp. 287-299. *In*: P. Schreier (Ed.). Bioflavour. Walter de Gruyther, Berlin.

Kurita, N., M. Miyaji, R. Kurane and Y. Takahara. 1981. Antifungal activity of components of essential oils. Agricultural and Biological Chemistry 45(4): 945-952.

Lanciotti, R., A. Gianotti, F. Patrignani, N., Belletti, E. M. Guerzoni and F. Gardin. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. Trends in Food Science and Technology 15: 201-208.

Lota, M. L., D.D. Serra D, F. Tomi and J. Casanova. 2000. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. Journal of Biochemical Systematics and Ecology 28: 61-78.

Ou, M. C., Y. H. Liu, Y. W. Sun and C. F. Chan. 2015. The composition, antioxidant and antibacterial activities of cold-pressed and distilled essential oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine vol.2015 https://doi.org/10.1155/2015/804091.

Sarrou, E., P. Chatzopoulou, K. Dimassi-Theriou and I. Therios. 2013. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. Molecules. 18: 10639-10647.

Sharma, N., and A. Tripathi. 2008. Effect of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. Microbiological Research 163(3): 337-344.

Simas D.L.R., S.B.M., Amorim, F.R.V., Goulart, C.S., Alviano, D.S. Alviano and A.J.R., Silva. 2017. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. Industrial Crops and Products 98: 108-115.

Yi, Q., R.E. Hoskins, E.A. Hillringhouse, S.S. Sorensen, M.W. Oberle, S.S. Fuller, and J.C. Wallace 2008. Integrating open-source technologies to build low-cost information system for improved access to public health data. International Journal of Health Geographics 7, 29(2008). https://doi.org/10.1186/1476-072x-7-29.